

10/507132
PCT/JP03/01980

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月12日

REC'D 24 APR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-066955

[ST.10/C]:

[JP2002-066955]

出願人

Applicant(s):

クミアイ化学工業株式会社

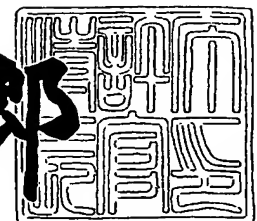
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3022766

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0049

【提出日】 平成14年 3月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡福田町蛭池 2 7 6 - 1 サンハイツ蛭池C号

【氏名】 角 康一郎

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市小泉 1 8 9 0 - 3

【氏名】 渡辺 哲

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県小笠郡菊川町加茂 1 8 0 9

【氏名】 河合 清

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県小笠郡菊川町平尾 1 1 4

【氏名】 清水 力

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県掛川市八坂 2 3 8 4 - 4

【氏名】 永山 孝三

【特許出願人】

【識別番号】 000000169

【氏名又は名称】 クミアイ化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子。

（a）配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

【請求項2】 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする請求項1記載の遺伝子。

【請求項4】 請求項1記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素

【請求項5】 請求項1記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。

【請求項7】 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性評価方法。

（a）評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、配列番号4に示すアミノ酸配列の75番目のバリンに相当するアミノ酸を同定する工程。

（b）上記（a）工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。

【請求項8】 上記（b）工程では、上記（a）工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする請求項7記載の感受性評価方法。

【請求項 9】 請求項 4 記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。

【請求項 10】 配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 75 番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

【請求項 11】 配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 75 番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、イネに発症するいもち病の原因菌として知られているいもち病菌におけるシタロン脱水酵素をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来技術】

いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe grisea*) によって引き起こされるイネいもち病はイネを栽培しているほとんどの国で認められているが、特に日本をはじめとする高温多湿な気候の地域では、農業上重大な病気の一つに挙げられる。従って高収量の稲作を達成するためには、イネいもち病の防除は必要不可欠である。近年、治療効果を持つ薬剤に代わり、予防効果のある箱処理型の薬剤の使用によって、いもち病菌防除における農家の労力が省力化される傾向にある。このような剤としてカルプロパミド (carpropamid; ((1RS,3SR)-2,2-dichloro-N-((R)-1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)) に代表されるシタロン脱水酵素 (以下、SCDH) 阻害剤を挙げることができる (Kurahashi et al., J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998; Motoyama et al., J. Pestic. Sci, 23, 58-61, 1998)。SCDHはメラニン生合成経路におけるシタロンから1,3,8-トリヒドロキシナフタレン(以下1,3,8-THN)への脱水反応を触媒する酵素である。

【0003】

いもち病菌がイネ葉表面のクチクラ層を破り侵入する際、感染特異的器官である付着器中のグリセロール濃度を80気圧にも上昇させるが、このグリセロールを付着器中に閉じこめるために細胞壁のメラニン層が必要不可欠となる（鎌倉ら，化学と生物，39，340-347，2001）。メラニンの生合成が阻害されると、付着器が形成できなくなる。従ってSCDH阻害剤は直接的に殺菌力を示す薬剤ではなく、病原性を抑えることで防除活性を現わす非殺菌性の薬剤である。

【0004】

糸状菌のSCDH遺伝子については、最初に*Pyricularia oryzae*で解明されたが、その塩基配列は公開されずにSCDHタンパク質の3次元構造だけが報告された（Lanquist et al., Structure, 2, 937-944, 1994）。その後、*Colletorichum lagenarium*（ウリ類炭素病菌）（Kubo et al., Appl. Environment. Microbiol, 62, 4340-4344, 1996; アクセッション番号D86079）で報告され、続いて、*Aspergillus fumigatus*（Tsai et al., Mol. Microbiol, 26, 175-183, 1997; アクセッション番号U95042）、*Pyricularia oryzae*（Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1998; アクセッション番号AB004741）そして*Ophiostoma floccosum*（Wang et al., アクセッション番号AF316575）で報告されている。また、カルプロパミドが結合したSCDHタンパク質の3次元構造についても報告されている（Nakasako et al., Biochemistry, 37, 9931-9939, 1998; Wawrzak et al., Proteins: Struct. Func. Genet, 35, 425-439, 1999）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、近年、カルプロパミド等のSCDH阻害剤に対する感受性が低下したいもち病菌（以下、「耐性いもち病菌」と称する。）が見出された。上述したように、カルプロパミド等のSCDH阻害剤は稲作において非常に重要な薬剤であるため、耐性いもち病菌における感受性決定要因を究明し、且つ、耐性いもち病菌の防除対策を立てることは、安定した稲作を継続する上で非常に重要である。

【0006】

しかしながら、耐性いもち病菌における感受性決定要因の解明や、耐性いもち病菌の生息地域の特定等、耐性いもち病菌に関する研究はほとんどなされていない

いのが現状である。

そこで、本発明は、上述したような現状に鑑み、耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することができる遺伝子を提供することを目的とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

上述した目的を達成するために、本発明者が鋭意検討した結果、耐性いもち病菌における感受性決定要因を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を包含する。

【 0 0 0 8 】

(1) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

(2) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから 1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする

(1) 記載の遺伝子。

【 0 0 0 9 】

(3) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする (1) 記載の遺伝子。

(4) (1) 記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素。

(5) (1) 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(6) (5) 記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。

【 0 0 1 0 】

(7) 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性評価方法。

(a) 評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の 75 番目のバリンに相当するアミノ酸を同定

する工程。

(b) 上記 (a) 工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。

【0011】

(8) 上記 (b) 工程では、上記 (a) 工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする (7) 記載の感受性評価方法。

(9) (4) 記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。

【0012】

(10) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

(11) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る遺伝子は、シタロン脱水酵素阻害剤（以下、SCDH阻害剤）の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すシタロン脱水酵素（以下、「変異SCDH酵素」と呼ぶ）をコードするものである。なお、以下の説明において、SCDH阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性が低下するシタロン脱水酵素を、単にSCDH酵素或いは野生型SCDH酵素と呼ぶ。

【0014】

SCDH阻害剤としては、例えば、カルプロパミド (carpropamid; (2,2-dichloro-N-(1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)、フェノキサニル (1-(2,4-dichlorophenyl)oxy-N-(1-cyano-1,2-dimethyl)propyl ethanecarboxamide)、ジクロシメット (N-[1-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1-c

ano-2,2-dimethylpropanecarboxamide) 等が挙げられる。SCDH阻害剤は、通常、いもち病菌のイネに対する感染阻害剤として使用され、SCDH酵素の活性を阻害する。具体的に、SCDH酵素は、図1に示すメラニン生合成経路において、シタロンから1,3,8-トリヒドロキシナフタレン（以下、「1,3,8-THN」と呼ぶ）への脱水反応、及び、バーメロンから1,8-ジヒドロキシナフタレンへの脱水反応を触媒する。

【0015】

SCDH阻害剤は、このSCDH酵素の活性を阻害することによって、いもち病菌における付着器の形成を阻害し、イネに対する病原性を抑制することができる。すなわち、SCDH阻害剤は、いもち病菌の感染力を低下させることによって、いもち病の発生を防止する。これに対して、変異SCDH酵素は、SCDH阻害剤の存在下であっても、上述した酵素活性を示すことによって、いもち病菌に対してSCDH阻害剤に対する抵抗性を付与している。したがって、変異SCDH酵素を発現するいもち病菌（以下、「耐性いもち病菌」又は「抵抗性株」と呼ぶ）は、SCDH阻害剤の存在下であってもメラニン生合成が阻害されず、付着器を形成することができ、イネ葉表面のクチクラ層を破り侵入することができる。すなわち、耐性いもち病菌は、SCDH阻害剤の存在下であっても高い感染力を示す。

【0016】

変異SCDH酵素としては、配列番号2のアミノ酸配列からなるものが挙げられる。また、変異SCDH酵素は、配列番号2のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すものであってもよい。ここで、1以上とは、例えば、1～30個、好ましくは、1～20個、より好ましくは、1～10個を意味する。

【0017】

野生型SCDH酵素又は変異SCDH酵素における酵素活性は、シタロンから1,3,8-THNへの脱水反応、或いは、バーメロンから1,8-ジヒドロキシナフタレンへの脱水反応を測定することによって評価できる。すなわち、野生型SCDH酵素又は変異SCDH酵素と基質（シタロン又はバーメロン）とを含む反応溶液で酵素反応を進行さ

せ、基質の減少量及び/又は反応産物（1,3,8-THN又は1,8-ジヒドロキシナフタレン）の増加量を測定することによって、野生型SCDH酵素又は変異SCDH酵素の酵素活性を評価できる。

具体的には、シタロンから1,3,8-THNへの酵素反応を分光的に測定することができる。例えば、シタロンの減少量を測定するには、Motoyama et al., J. Pestic. Sci, 23, 58-61, 1998に準じて行うことができる。

【0018】

一方、1,3,8-THNの増加量は、基質であるシタロンと生成物である1,3,8-THNのそれぞれのUV吸収スペクトル（図2に示す）から、200～300nmでは1,3,8-THNの吸収はシタロンの吸収と被さっているが、340～360nmではシタロンの吸収がほとんど無視できるため、340～360nmでのUV吸収スペクトルで測定することができる。なお、340～360nmでのUV吸収スペクトルで測定する方法では、酵素反応を100秒間測定することによるレートアッセイにより行うことにより、SCDH阻害剤に対する野生型SCDH酵素又は変異SCDH酵素の感受性を測定することができる。

【0019】

この方法によれば、所定の濃度でSCDH阻害剤（例えばカルプロパミド）を添加した反応溶液において酵素反応を進行させ、340～360nmでのUV吸収スペクトルを測定することによって、反応産物である1,3,8-THNの合成量を測定できる。そして、測定した1,3,8-THNの合成量を、SCDH阻害剤の非存在下における1,3,8-THNの合成量で除算することによって、SCDH阻害剤の当該濃度における阻害率とする。そして、野生型SCDH酵素及び変異SCDH酵素について、SCDH阻害剤の濃度を変化させて阻害率を測定し、各酵素におけるI50値を算出する。野生型SCDH酵素のI50値と変異SCDH酵素のI50値とから、R/S比を算出することによって、変異SCDH酵素におけるSCDH阻害剤に対する感受性を評価することができる。例えば、算出したR/S比が2以上である場合、変異SCDH酵素は野生型SCDH阻害剤と比較して、SCDH阻害剤に対する感受性が低いと定義できる。

【0020】

なお、変異SCDH酵素の酵素活性は、上述した方法に限定されず、如何なる方法を適用して測定しても良い。変異SCDH酵素の酵素活性方法としては、例えば、酵

素反応生成物である1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレンのHPLCによる分析定量等を用いた方法を例示することができる。

【0021】

変異SCDH酵素をコードする遺伝子（以下、「変異SCDH遺伝子」と呼ぶ）は、上述した変異SCDH酵素をコードする塩基配列を含むものであれば、イントロンを含むゲノムDNAから得たものでも良いし、イントロンを含まないcDNAから得られたものであっても良い。

【0022】

変異SCDH遺伝子は、例えば、いもち病菌のSCDH酵素のcDNA配列から設計したプライマーと、SCDH阻害剤に抵抗性を示すいもち病菌（以下、「耐性いもち病菌」と呼ぶ）のゲノムDNAとを用いたPCRによって得ることができる。また、変異SCDH遺伝子は、上記プライマーと、耐性いもち病菌から抽出したmRNAとを用いたRT-PCRによって得ることもできる。なお、いもち病菌のSCDH酵素のcDNA配列は公知であり、MotoyamaらのBiosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988（DNAデータバンク、アクセッション番号 AB004741）に記載されている。

【0023】

このような方法によって得られた変異SCDH遺伝子は、例えば、配列番号1に示すような塩基配列を含んでいる。変異SCDH遺伝子及び野生型SCDH酵素をコードする遺伝子（以下、SCDH遺伝子と呼ぶ）の塩基配列（cDNA）を比較した結果を図3に示す。また、ゲノムDNAにおける変異SCDH遺伝子及びSCDH遺伝子の塩基配列を比較した結果を図4に示す。図3及び図4に示すように、変異SCDH遺伝子においては、SCDH遺伝子における223番目のG（グアノシン）がA（アデノシン）にホモに変異している。この変異は、野生型SCDH酵素における75番目のバリン（Val）がメチオニン（Met）へ変異することを意味している。

【0024】

また、変異SCDH遺伝子及びSCDH遺伝子の塩基配列を比較した結果、変異SCDH遺伝子においては、450番目のT（チミジン）がC（シチジン）に変異していた。但し、この変異はアミノ酸変異を伴っていない。

また、図3及び図4の比較から、変異SCDH遺伝子は、変異SCDH酵素のアミノ酸

配列における42番目及び43番目の間と141番目及び142番目の間とに、それぞれ81塩基と約89塩基のイントロンを有している。なお、後者のイントロン（変異SCDH酵素のアミノ酸配列における141番目及び142番目の間）はポリA鎖が連なっていたため、PCRを行った際、長さの異なるものが生成してしまい明確な長さを決定できなかったため、約89塩基となっている。

【0025】

変異SCDH遺伝子としては、配列番号1の塩基配列には限定されず、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質、或いは、配列番号2のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列であればいかなるものであってもよい。このような塩基配列としては、例えば、配列番号1の塩基配列において、アミノ酸変異を伴わない塩基置換が生じた塩基配列を挙げることができる。

【0026】

また、変異SCDH遺伝子としては、配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列であって、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列からなるものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、10mM～300mM、好ましくは20～100mMであり、温度が25℃～70℃、好ましくは42℃～55℃での条件をいう。

【0027】

変異SCDH遺伝子は、例えば、SCDH阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から得られたゲノムDNAを鋳型とし、所定の配列を有する一対のプライマーを用いたPCRによって得ることができる。ゲノムDNAの調製法としては、何ら限定されないが、例えば、CTBA(cetyltrimethylammonium bromide)を抽出液として用いる方法、SDS/フェノール又はフェノール/クロロホルム抽出による方法、また市販のキット、例えばQiagen社のDNeasy Plant System、Amersham Biosciences社のNucleon PhytoPureキット等を挙げることができる。

【0028】

さらに、変異SCDH遺伝子は、SCDH阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から全量mRNAを抽出し、全量mRNA及び所定の配列を有する一対のプライマーを用いたRT-PCRによっても得ることができる。いもち病菌からの全量mRNAの抽出方法としては、何ら限定されないが、例えば、グアニジウム法、SDS-フェノール法、フェノール/クロロホルム抽出、若しくは市販の例えばQiagen社のRNeasy Total RNA System、Amersham Biosciences社のQuick Prep Micro mRNA Purification Kit、Quick Prep Total RNA Extraction Kit等を挙げるができる。

【0029】

上述したPCR及びRT-PCRに使用する一対のプライマーは、例えば遺伝子バンクに登録されているいもち病菌のゲノムDNAの塩基配列に基づいて、SCDH遺伝子を挟み込むように設計することができる。一対のプライマーは、いもち病菌のゲノムDNAの塩基配列に基づいて更に機能的な配列を付加して設計することもできる。機能的な配列とは、ベクターに連結するための制限酵素の認識配列や、フレームを合わせるための挿入配列等を挙げるができる。

【0030】

例えば、一対のプライマーとしては、以下のものを挙げるがこれに限定されるものではない。

プライマー1(配列番号5):5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3'

プライマー2(配列番号6):5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3'

プライマー3(配列番号7):5'-AGTTCGAACTGGAATTCAACCGGCACGCATGATGCATGCATTTA-3'

プライマー4(配列番号8):5'-ATGGGTTCGCAAGTTCAAAAG-3'

プライマー5(配列番号9):5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3'

プライマー6(配列番号10):5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3'

プライマー7(配列番号11):5'-ATCGTCGACGTGAATTCGTCTTGTAAGCCGCCAAC-3'

【0031】

なお、プライマー1、4、6及び7はセンスプライマーであり、プライマー2、3及び5はアンチセンスプライマーである。したがって、一対のプライマーとしては、一方をセンスプライマーから選択し、他方をアンチセンスプライマーから選

択する。

【0032】

プライマー2は、公知文献 (Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988) に開示された塩基配列に基づいて合成したため、アンダーラインで示した塩基が「G」となっている。しかしながら、DNAデータバンクのアクセッション番号AB004741に記載された相当する塩基は「C」である。当該塩基は「C」が正しいが、当該塩基が「G」であっても、PCR及びRT-PCRの結果には影響しない。プライマー3及びプライマー7中のアンダーラインで示した文字はEco RI認識配列を示している。このEco RI認識配列は、タンパク発現ベクター等に組み込む際利用できる。プライマー3及びプライマー7において、Eco RI認識配列より5'側の塩基配列は、Eco RIがEco RI認識配列を認識するように余裕を持たせるために付加した塩基配列である。プライマー7において、Eco RI認識配列より3'側の2個の塩基配列（すなわち、プライマー7における18番目及び19番目の「GT」）は、タンパク質発現ベクター（pGEX-2T）に組み込む際のフレーム合わせ用の塩基配列である。

【0033】

例えば、プライマー7とプライマー3を用い全量RNAを鋳型としてRT-PCRを行い、得られたPCR生成物をEco RI処理後、予めEco RI消化とアルカリフォスファターゼでのBAP処理を行ったpGEX-2T (Amersham Biosciences社製) に組み込んでなるプラスミドを調製することができる。このプラスミドはRice Blast Mutant SCDH cDNA (FERM BP-7948)として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成14年3月8日付でブタベスト条約に基づき国際寄託されている。

【0034】

このプラスミド (Rice Blast Mutant SCDH cDNA) は、大腸菌等の宿主内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（以下、GSTと呼ぶ）との融合タンパク質としてSCDH酵素を発現することができる。なお、無細胞系のタンパク質発現システムに適用できるように、変異SCDH遺伝子を有するプラスミドを構築してもよい。

さらにまた、変異SCDH遺伝子は、SCDH阻害剤の存在下でもイネに対して感染す

るいもち病菌由来のcDNAライブラリー及び所定のプローブを用いて得ることができる。

【0035】

さらにまた、変異SCDH遺伝子は、野生型SCDH遺伝子に対して突然変異を誘発して得ることもできる。例えば、野生型SCDH遺伝子における75番目のバリン (Val) をコードするコドン、メチオニン (Met) をコードするコドンに変異させるように設計したプライマーを用いた、いわゆる部位特異的突然変異法によって、変異SCDH遺伝子を得ることができる。部位特異的突然変異法を用いて変異SCDH遺伝子を得るには、市販のキットを使用することができる。市販のキットとしては、例えば、宝酒造社のTaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis kit等を挙げることができる。

【0036】

ところで、上述した変異SCDH遺伝子は、後述する実施例で示すように、耐性いもち病菌の感染力を低下させるような新規なSCDH阻害剤をスクリーニングする際に有効である。特に、上述した変異SCDH遺伝子を発現可能な状態で組み込んだ発現ベクターを用いて、当該変異SCDH酵素を発現させ、新規SCDH阻害剤としての候補物質が存在する条件下で、発現した変異SCDH酵素の酵素活性を測定する。当該候補物質が存在する場合に、変異SCDH酵素の酵素活性が低下しているか否かを判定することで新規なSCDH阻害剤をスクリーニングすることができる。

【0037】

特に、従前の判定方法では、候補物質の存在下における、いもち病菌の付着器形成阻害を、イネそのものを使用したいわゆるポット試験やシャーレ寒天上に貼ったセロハンを付着器が破るのを観察する試験で評価しており、迅速なSCDH阻害剤のスクリーニングを行うことが困難であった。これに対して、上述した方法によれば、簡便な方法によってSCDH酵素の酵素活性を測定できるため、新規なSCDH阻害剤の迅速なスクリーニングを行える。

【0038】

また、上述した変異SCDH遺伝子の塩基配列解析から、SCDH酵素における75番目のバリン (Val) がメチオニン (Met) へ変異した変異SCDH酵素において、SCDH阻

害剤の存在下で酵素活性を示すため、SCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を解析することによって、解析対象のSCDH遺伝子がSCDH阻害剤に対して耐性を有するか否かを調べられる。

【0039】

すなわち、所定の地域等で採取されたいもち病菌（解析対象のいもち病菌）がSCDH阻害剤に対する感受性があるか否かを検討する際、当該いもち病菌におけるSCDH遺伝子（解析対象のSCDH遺伝子）の、SCDH酵素における75番目のアミノ酸を同定することによって、当該いもち病菌のSCDH阻害剤に対する感受性を評価できる。

【0040】

解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、如何なる方法を用いても良く、特に限定されない。SCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、例えば、少なくともSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む塩基配列を挟み込むように設計された一对のプライマーと、鋳型DNA（cDNA又はゲノムDNA）を用いて、鋳型DNAの所定の領域について塩基配列を決定する。決定した塩基配列に基づいて、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を同定することができる。

【0041】

解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、解析対象のいもち病菌を固体培養した後、糸状菌糸体を取り、当該菌糸体に対してマイクロウェーブを照射することで、鋳型となるゲノムDNAを得ることが好ましい。マイクロウェーブを照射するには、例えば、電子レンジ等を使用することができる。この方法により鋳型となるゲノムDNAを得た場合には、解析対象のいもち病菌を液体培養した後に集菌し、定法に従ってゲノムDNAを抽出する方法と比較して、非常に短時間でゲノムDNAを得ることができる。

【0042】

さらに、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、一方のプライマーを、75番目のアミノ酸をコードする

塩基配列の近傍、例えば40塩基上流にハイブリダイズするように設計することが好ましい。これにより、非常に短時間に解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定することができる。

【0043】

さらにまた、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを使用することができる。例えば、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸がメチオニンである場合に、当該SCDH酵素をコードする遺伝子にこのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズするように、オリゴヌクレオチドを設計する。そして、このオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるコロニーハイブリダイゼーションやサザンハイブリダイゼーション等の方法により、解析対象のいもち病菌におけるSCDH酵素の75番目のアミノ酸を同定することができる。この方法によっても、解析対象のいもち病菌におけるSCDH阻害剤に対する感受性を評価することができる。

【0044】

さらにまた、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を解析する際には、一本鎖DNA高次構造多型（以下、SSCPと呼ぶ）を利用することもできる。すなわち、予め、野生型のSCDH遺伝子と耐性SCDH遺伝子とにおける、一本鎖高次構造の相違に起因する泳動パターンの違いを検出しておき、解析対象のSCDH遺伝子の一本鎖高次構造に基づく泳動パターンと比較する。これによって、解析対象のSCDH遺伝子が、SCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードする塩基配列を同定することができる。解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を解析する際にSSCPを利用することによって、解析対象のいもち病菌のSCDH阻害剤に対する感受性を極めて短時間に判別することができる。

【0045】

さらにまた、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を解析する際には、改変したPCR-制限断片長多型(RFLP)解析法（以下、「改変PCR-RFLP法」と呼ぶ）を適用することもできる。すなわち、改変PCR-RFLP解析法によって、解析対象

いもち病菌のSCDH酵素における、75番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異(以下、Val75Met変異と呼ぶ)を簡易的に検定することもできる。

【0046】

改変PCR-RFLP解析法に際して、PCRに用いる一方のプライマーとしては、223番目の塩基(SCDH酵素における75番目のアミノ酸をコードするコドンに含まれる塩基)を含まず、且つ、223番目塩基の種類によっては、3'末端側に制限酵素認識配列を有するように設計する。このとき、当該一方のプライマーは、前記制限酵素認識配列を含むように、鋳型となるゲノムDNA或いはcDNAの塩基配列と一部ミスマッチする塩基を含んでいても良い。制限酵素認識配列としては、特に限定されないが、Xba Iが認識する配列を使用することができる。

【0047】

改変PCR-RFLP解析法では、先ず、上述したように設計した一对のプライマーと、鋳型となるゲノムDNA或いはcDNAを用いてPCRを行う。PCRに際しては、温度や時間等の各種条件を適宜設定することによって、鋳型とミスマッチする塩基が含まれているプライマーを用いても、所望の鋳型の領域を増幅することができる。PCRによって得られた産物は、223番目の塩基によっては上記一方のプライマーとともに制限酵素認識配列を含んでおり、また、223番目の塩基によっては制限酵素認識配列を含まないものとなる。

【0048】

次に、PCRによって得られた産物を、上記一方のプライマーに含まれる制限酵素認識配列を認識する制限酵素で処理する。この制限酵素処理によれば、223番目の塩基の違いによって得られる断片長が異なることとなる。次に、制限酵素処理によって得られた断片長を、例えば、電気泳動等の方法によって検出することによって、223番目の塩基を同定することができ、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を解析することができる。

【0049】

さらにまた、解析対象のSCDH酵素における75番目のアミノ酸を解析する際には、一般的に知られている一塩基多型タイピング方法を適用することもできる。一塩基多型タイピング方法としては、例えば、Applied Biosystems社のSNaPshot M

ultiplex Kit (シングルプライマー伸長反応)、Qiagen社のMasscode system (質量分析システム)、Sequenom社のMassARRAYシステム、宝酒造社のUCAN法、Cleaveaseを用いたインバーダー法、マイクロアレイを使用した方法等が挙げられる。

【0050】

【実施例】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。しかしながら、本発明の技術的範囲は、これら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

本例では、まず、SCDH酵素を抽出する際に用いる糸状菌糸体を調製した。標準(野性)菌株のイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 及びカルプロパミド耐性を示すイネいもち病菌 (抵抗性株 (A及びB)) の孢子溶液 (10^5 /ml) を、それぞれ yeast 抽出物 (5g)、グルコース (20g)、 KH_2PO_4 (0.5g)、 Na_2HPO_4 (0.5g) 及び CaCl_2 (0.5mg) を含む YGPCa 液体培養液 (pH6.5) 200ml に接種し、27℃ で 4~5 日培養した。

【0051】

培養後、培養液を遠心分離にかけて糸状菌糸を収集後、蒸留水で洗浄し、菌糸重量の 5 倍量の冷アセトンを加え、Waring blender でホモジナイズした。ホモジネートを遠心し ($15,000 \times g$, 20 分)、沈降物を 4℃ で乾燥してアセトンパウダーを得た。このアセトンパウダーを -85℃ で保存した。

【0052】

得られたアセトンパウダーを用いて、SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製し、当該 SCDH 酵素の酵素活性を測定した。SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製する際には、アセトンパウダーを 20ml の 1/15M リン酸カリウムバッファー (pH6.8) に懸濁し、氷冷下、30 分攪拌した後、 $15,000 \times g$ で 15 分間遠心分離した。遠心分離により得られた上澄みを粗酵素液とした。

【0053】

次に、粗酵素液を用いて SCDH 酵素の酵素活性を測定する際には、まず、1mM EDTA 含有 100mM リン酸バッファー (pH6.8) 1,300 μ l、20mM シタロン (エタノール溶液) 30 μ l、適当な濃度のカルプロパミドのエタノール溶液 30 μ l および超純水 1,

440 μ lを混合し、27℃で2分間プレインキュベートした。次に、粗酵素液 200 μ lを添加して酵素反応を開始した。酵素反応によりシタロンから生成された1,3,8-THN量をUV350nmでの吸光度上昇として、100秒間モニタリングすることにより粗酵素液に含まれるSCDH酵素に起因する酵素活性を測定した。なお、基質のシタロンはカルプロパミド存在下で標準（野性）菌を液体培養し、得られた菌糸体から常法（Kurahashi et al., J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998）により調製した。

【0054】

結果を図5に示す。この結果を用いて50%阻害濃度(I50値)をプロビット解析により算出した。その結果、標準（野性）菌から抽出された粗酵素液ではカルプロパミドに対するI50値が7.45nMであったのに対し、抵抗性菌株A及びBではそれぞれ163nM及び157nMであった。これらの値から、R/S比はおおよそ21.5であった。このことは、抵抗性菌株A及びBにおけるカルプロパミド耐性の要因が、カルプロパミドのターゲットであるシタロン脱水酵素の感受性が低下したことによることを示唆した。

【0055】

実施例2

本例では、まず、いもち病菌からゲノムDNA及びmRNAを抽出するため、以下のように入状菌糸体を調製した。まず、標準（野性）菌及びカルプロパミド耐性を示すいもち病菌（抵抗性株（A及びB））をオートミール培地上でそれぞれ培養した。培養後、菌糸体部分を20mlのpotato-dextrose (PD)液体培地に接種し、28℃で3日間、前培養した。前培養によって生長した入状菌糸が団子状となるため、これを滅菌したWaring blenderでホモジナイズし、その内1mlずつを20mlのPD液体培地中で更に3～5日間培養した。菌糸体を減圧濾過により濾別後、蒸留水で洗浄した。これらの菌子体を液体窒素下、乳鉢ですりつぶし、微粉末とし、-85℃で保存した。これにより、標準（野性）菌由来の微粉末、抵抗性株A由来の微粉末及び抵抗性株B由来の微粉末が得られた。

【0056】

抵抗性株A由来の微粉末を用いて全量RNAを抽出する際には、Rneasy Plant Min

i Kit(Qiagen社製)を用い、添付のプロトコルに従った。得られた微粉末を用いてゲノムDNAを抽出する際には、Dneasy Plant Mini Kit(Qiagen社製)を用い、添付のプロトコルに従った。RNA濃度は分光光度計でOD260での吸光度を測定することにより定量した。DNA濃度は1% アガロースゲル上での明度の様子か、Hoe 33258 (ヘキスト社製)を用いた蛍光スペクトルの測定によった。

【0057】

次に、得られた全量RNAを用いて抵抗性株の変異SCDH遺伝子を含むcDNAを調製した。変異SCDH遺伝子を含むcDNAを調製する際には、先ず、得られたRNA(2 μ g)を、最終容量が50 μ lとなるように、2 μ lのoligo(dT)20(10pmol/ μ l)、各々2 μ lのプライマー1(5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3', 25pmol/ μ l)及びプライマー2(5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3', 25pmol/ μ l)並びにRT-PCR bead (Amersham Biosciences社製)と混合し反応溶液を調製した。反応は以下の条件に従って行った。cDNAの合成として42℃で30分、続いて95℃で30分反応した。続いて、合成したcDNAを鋳型とするPCR反応として95℃で30秒、55℃で1分及び72℃で1分からなるステップを35サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で7分間反応を完結させた。反応後の反応溶液を、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Biosciences社製)を用いて精製することによってRT-PCR生成物を得た。なお、標準菌株のSCDH遺伝子を含むcDNA及び抵抗性株BのSCDH遺伝子を含むcDNAも上述した方法と同様にして、得ることができた。

【0058】

一方、得られたゲノムDNAを用いて抵抗性株Aの変異SCDH遺伝子を含むDNAを調製した。変異SCDH遺伝子を含むDNAを調製する際には、先ず、得られたゲノムDNA 4 μ lを、最終容量が25 μ lとなるように、各々1 μ lのプライマー1(5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3', 25pmol/ μ l)及びプライマー3(5'-AGTTCGAACTGGAATTCAACCGGCA CGCATGATGCATGCATTTA-3', 25pmol/ μ l)及びPCR bead (Amersham Biosciences社製)と混合して反応溶液を調製した。反応は以下の条件に従って行った。ゲノムDNAを鋳型とするPCR反応として、95℃で30秒、55℃で1分及び72℃で2分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で7分間反応を完結させた。反応後の反応溶液をGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amers

ham Biosciences社製)を用いて精製することによってPCR生成物を得た。なお、標準菌株のSCDH遺伝子を含むDNA及び抵抗性株BのSCDH遺伝子を含むDNAも上述した方法と同様にして、得ることができた。

【0059】

次に、得られたRT-PCR産物及びPCR産物を用いて、変異SCDH遺伝子を含むcDNA及び変異SCDH遺伝子を含むDNAの塩基配列を決定した。塩基配列の決定に際しては、Applied Biosystems社のBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いた。

【0060】

このキットを用いたシーケンス反応は、鋳型のRT-PCR或いはPCR産物、3.2pmolのプライマー(プライマー1, プライマー3, プライマー5及びプライマー6)及び8 μ lのterminator pre-mixを混合して総量20 μ lの反応溶液中で行った。反応条件としては、96℃で10秒、50℃で5秒及び60℃で4分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、60℃で7分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等の成分をAuto Seq G-50(Amersham Bioscience社製)を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物をApplied Biosystems社のABI 310 Genetic Analyzerで解析して塩基配列決定した。RT-PCR産物を鋳型として決定した変異SCDH遺伝子の塩基配列を配列番号1に示し、変異SCDH遺伝子によりコードされる変異SCDH酵素のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0061】

RT-PCR産物を鋳型として変異SCDH遺伝子のcDNAについて解析した結果を図3に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌のSCDH遺伝子の塩基配列(登録番号AB004741、上段)と、標準菌株から得られたRT-PCR産物を用いて解析されたSCDH遺伝子の塩基配列(中段)と、抵抗性株Aから得られたRT-PCR産物を用いて解析された変異SCDH遺伝子の塩基配列(下段)とを比較した図である。

【0062】

また、PCR産物を鋳型として、ゲノムDNAに存在する変異SCDH遺伝子について解析した結果を図4に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌のSCDH遺伝子の塩基配列(登録番号AB004741、上段)と、標準菌株から得られたPC

R産物を用いて解析されたSCDH遺伝子の塩基配列（中段）と、抵抗性株Aから得られたPCR産物を用いて解析された変異SCDH遺伝子の塩基配列（下段）とを比較した図である。

【0063】

これら図3及び図4から、抵抗性株Aにおいては、SCDH遺伝子のcDNA塩基配列における223番目のG(グアノシン)がA(アデノシン)にホモに変異していることが判った。これは、標準菌株のSCDH酵素のアミノ酸配列における75番目のバリン(Val)がメチオニン(Met)へ変異することを意味していた。またcDNA塩基配列における450番目の塩基が登録されている塩基配列(登録番号AB004741、図3において上段)ではT(チミジン)であったが、標準菌株及び抵抗性株ではC(シチジン)であった。但しこのcDNA塩基配列における450番目の塩基の変異は、アミノ酸変異を伴っていないので、SCDH阻害剤に対する感受性には何ら関与していないと考えられる。

【0064】

また、図4から、配列番号3に示した塩基配列における42番目と43番目の間及び141番目と142番目の間に、それぞれ81塩基と約89塩基のイントロンを確認した。後者はポリA鎖が連なっていたため、PCRを行った際、長さの異なるものが生成してきてしまい明確な長さは確認できなかったため、約89塩基となっている。

【0065】

実施例3

いもち病菌のSCDH酵素における、75番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異（以下、Val75Met変異と呼ぶ）の簡易検定法を検討した。

オートミール培地（5%オートミール、2%シュクロース及び1.5%寒天）上、28℃で生育させたイネいもち菌の菌体を爪楊枝で取り、1.5μlのマイクロチューブに移した。蓋をして、電子レンジ(600W)で5～7分、マイクロウェーブを照射した。この処理によって、菌体の細胞壁を破壊した。

【0066】

次に、マイクロチューブ内に50μlのTEバッファー(pH8.0)を加え、激しく攪拌し、14,000rpmで10分間遠心分離した。遊離したゲノムDNAが溶け込んだ上澄み中

を、別のマイクロチューブに移し、 -20°C で保存した。 $1\sim 5\mu\text{l}$ の上澄みを、最終容量が $25\mu\text{l}$ となるように、各々 $1\mu\text{l}$ のプライマー4($5'-\text{ATGGGTTGCGCAAGTTCAAAA G-3'}$, $25\text{pmol}/\mu\text{l}$)、プライマー5($5'-\text{GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3'}$, $25\text{pmol}/\mu\text{l}$)及びPCR bead (Amersham Biosciences社製)と混合して反応溶液を調製した。PCR反応としては、 95°C で30秒、 55°C で1分及び 72°C で2分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、 72°C で7分間反応を完結させた。反応溶液をInvisorb Spin PCRapid Kit(Invitex社製)を用いて精製し、PCR産物を得た。反応溶液に含まれるPCR産物は、Applied Biosystems社のBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いてシーケンス反応を行った。

【0067】

シーケンス反応に際しては、鋳型となるPCR産物、 3.2pmol のプライマー6($5'-\text{ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3'}$)及び $8\mu\text{l}$ のterminator pre-mixを混合し、総量 $20\mu\text{l}$ の反応溶液を調製した。シーケンス反応としては、 96°C で10秒、 50°C で5秒及び 60°C で4分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、 60°C で7分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等をAuto Seq G-50(Amersham Biosciences社製)を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物を同社のABI 310 Genetic Analyzerでシーケンス解析した。この際、Amersham Biosciences社製の $47\text{cm} \times 50\mu\text{m}$ のショートキャピラリーカラムを用いることにより、1サンプル当たり約35分という短時間で75番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに変異していることを判定できた。

【0068】

実施例4

一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析法を適用した、いもち病菌のSCDH酵素における、75番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異(以下、Val75Met変異と呼ぶ)の簡易検定法を検討した。

実施例3と同様に、いもち病菌糸状菌糸体をマイクロウェーブ照射してゲノムDNA溶液を簡易に調製した。このゲノムDNA溶液 $5\mu\text{l}$ を、最終容量が $25\mu\text{l}$ となるように、各々 $1\mu\text{l}$ のプライマー6($5'-\text{ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3'}$, $25\text{pmol}/\mu\text{l}$)、プライマー5($5'-\text{GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3'}$, $25\text{pmol}/\mu\text{l}$)及びPCR bead (Ame

Amersham Biosciences社製)と混合して反応溶液を調製した。PCR反応としては、95℃で30秒、55℃で1分及び72℃で2分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で7分間反応を完結させた。この反応の結果、215bpのPCR生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Biosciences社製)を用いて、反応溶液に残存するtaq DNA polymeraseやプライマー等を除去した。

【0069】

その後、SSCPのためのloading bufferとして、0.5M EDTA(pH8.0)0.4ml、ブロモフェノールブルー10mg及びホルムアミド10mlを混合したものを調製した。反応溶液とloading bufferとを1:1で混合し、85℃で15分加熱した後、一気に氷冷した。これにより、反応溶液に含まれるPCR産物を一本鎖DNAとした。

【0070】

次に、反応溶液及びloading bufferの混合液を用いて、Amersham Biosciences社のPhastSystem 全自動電気泳動システムで電気泳動を行った。ゲル担体及びバッファー試薬として、同社のPhastGel Homogeneous 12.5とPhastGel Native Buffer Stripsを用い、400V、10mA、2.5W、4℃、100Vhで前泳動した後、400V、10mA、2.5W、4℃、200Vh本泳動した。その結果を図6A及びBに示した。なお、図6Aは、上述したGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いた精製を行わずに上記電気泳動を行った場合の結果である。図6Bは、上述したGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いて精製を行った後に上記電気泳動を行った場合の結果である。

【0071】

図6A及びBそれぞれの一本鎖DNAの泳動パターンが異なるが、これはPCR溶液中のバッファー組成によるものと考えられる。いずれにしても、図6A及びBから標準菌株とカルプロバミド耐性菌株では泳動パターンに違いが見られ、それぞれを識別することが可能であった。

【0072】

実施例 5

変異SCDH遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築し、SCDH阻害剤に対する抵抗

性を検討した。

タンパク質発現ベクターであるpGEX-2T(Amersham Biosciences社製)にいち病菌のシタロン脱水酵素遺伝子を組み込むため、Eco RI切断部位を末端に有するプライマー7(5'-ATCGTCGACGTGAATTCGTCTTGTAAGCCGCCAAC-3')とプライマー3(5'-AGTTTCAACTGGAATTCAACCGGCACGCATGATGCATGCATTTA-3')を用いRT-PCRを行った。このRT-PCRは、実施例1に記載した方法に準じて行った。プライマー7及び3は、それぞれSCDH遺伝子の読み枠(ORF)の上流及び下流に位置し、SCDH酵素のコード領域全てを挟み込んでいる。

【0073】

RT-PCRを行う際には、まず、標準(野性)菌或いはカルプロパミド耐性いもち菌から抽出した全量RNA(各々2 μ g)を、2 μ lのoligo(dT)20(10pmol/ μ l)と、各々2 μ lのプライマー4(25pmol/ μ l)及びプライマー3(25pmol/ μ l)と、RT-PCR bead(Amersham Biosciences社製)とを混合し、最終容量50 μ lの反応溶液を調製した。反応は以下の条件によって行った。反応溶液を42℃で30分、続いて95℃で30分反応してcDNA鎖を合成した。その後、引き続いて95℃で30秒、55℃で1分及び72℃で1分からなるステップを25サイクル繰り返してPCR反応を行った。反応終了後、反応溶液をGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Biosciences社製)を用いてRT-PCR生成物を精製し、その後、最終50 μ lの滅菌水で溶出した。

【0074】

次に、RT-PCR生成物を含む溶液のうち30 μ lを、10 x H緩衝液(Takara社製)4 μ l、Eco RI 1 μ l(12u/ μ l、Takara社製)と混合して最終容量40 μ lとし、37℃で2時間制限酵素反応に供した。制限酵素反応後、反応溶液をGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Biosciences社製)で精製し、30 μ lの滅菌水で溶出した。

【0075】

一方、GST融合タンパク質発現ベクターであるpGEX-2T(Amersham Biosciences社製)1 μ gを10 x H緩衝液(Takara社製)1 μ l及びEco RI 1 μ l(12u/ μ l、Takara社製)と混合して最終容量10 μ lとし、37℃で1時間制限酵素反応に供した。この反

応液にBAP緩衝液 10 μ l (TOYOBO社製)、アルカリフォスファターゼ 2.5 μ l (0.4u/ μ l, BAP-101, TOYOBO社製) 及び滅菌水 77.5 μ l を加え、37℃で2時間脱リン酸化反応に供した。

【0076】

次に、2 μ l のEco RI消化されたRT-PCR生成物、1 μ l のEco RI/BAP処理されたpGEX-2T、2 μ l の滅菌水及び5 μ l のライゲーション緩衝液 I液 (Ver.2, Takara社製) と混合して反応液を調製し、16℃で12時間ライゲーション反応に供した。反応終了後、大腸菌 (JM109株) のコンピテントセル (Takara社製) に添付されているプロトコルに従い、反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。次に、形質転換された大腸菌JM109株を、アンピシリン50ppmを含むLB固体培地上に広げ、37℃で12時間静置培養した。培養後、数点のシングルコロニーを掻き取り、ダイレクトコロニーPCRを行った。そして、ダイレクトコロニーPCRの結果、目的の方向にSCDH遺伝子が挿入されたpGEX-2Tをスクリーニングし、更に、塩基配列を決定することによって、挿入されたSCDH遺伝子の塩基配列に間違いがないかを確認した。以上の方法の概略を図7に示した。また、以上の方法で得られたプラスミドはRice Blast Mutant SCDH cDNA (FERM BP-7948) として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成14年3月8日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託した。

【0077】

次に、SCDH遺伝子が正しく挿入されたpGEX-2Tベクターで形質転換された大腸菌を、50ppmアンピシリンを含むLB液体培地200mlでOD₂₆₀が0.6~1.0になるまで27℃で培養した。その後、イソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) を最終濃度1mMになるように添加し、更に27℃で5時間激しく攪拌培養した。培養後、遠心 (10,000 x g, 10分, 4℃) により大腸菌を集菌した。大腸菌を洗浄するため、冷却した1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) 10mlに一度懸濁させた後、再度遠心 (10,000 x g, 10分, 4℃) により大腸菌を集菌した。その後、再度、冷却した1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) 5mlに懸濁し、氷冷しながらマイクロチップで超音波処理した後、4℃、15,000 x gで20分遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

【0078】

この粗酵素溶液を用いて、カルプロパミドに対する感受性を測定した。カルプロパミドに対する感受性は、上述した実施例1と同様にして測定した。その結果を図8に示した。なお図8において、白抜きの円を結んだグラフ及び塗りつぶしの円を結んだグラフは、実施例1において測定したカルプロパミドに対する感受性の測定結果である。

【0079】

図8から、大腸菌中で発現させたGST融合SCDH酵素は、標準菌とカルプロパミド耐性菌の両方ともに、いもち病菌から抽出した粗酵素液に含まれるSCDH酵素と同じ薬剤感受性を示した。

さらに、SCDH阻害剤としてフェノキサニル及びジクロシメットについても同様に感受性を検討した。結果を図9に示す。

【0080】

図9より、GST融合SCDH酵素は、これらフェノキサニル及びジクロシメットに対しても耐性を示すことが判った。すなわち、これら図8及び図9に示した結果から、GST融合SCDH酵素は、様々なSCDH阻害剤の存在下において高い酵素活性を示すことが明らかとなった。したがって、SCDH阻害剤の存在下においてもイネに対して高い感染力を示す耐性いもち病菌を防除する薬剤を発見・開発する際に、GST融合SCDH酵素を用いて候補物質のスクリーニングを行うことができる。詳細には、候補物質の存在下において、GST融合SCDH酵素の酵素活性を測定し、当該酵素活性を有意に低下させた候補物質を選択する。選択された候補物質は、変異SCDH酵素の酵素活性を低下させ、耐性いもち病菌の感染力を低下させる。これによって、耐性いもち病菌に起因するいもち病の発生を防止できる。

【0081】

実施例6

いもち病菌のSCDH酵素における、Val75Met変異の簡易検定法について、PCR-RFLP法を応用して検討した。実施例3と同様に、いもち病菌糸状菌糸をマイクロウェーブ照射してゲノムDNA溶液を簡易に調製した。このゲノムDNA溶液5 μ lを、最終容量が25 μ lとなるように、各々1 μ lのプライマー8(配列番号12、5'-TTC

GTCGGCATGGTCTCGAGCATCTAG-3', 25pmol/ μ l)、プライマー5(5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3', 25pmol/ μ l)及びPCR bead (Amersham Bioscience社製)と混合して反応溶液を調製した。

【0082】

プライマー8中の下線を付した塩基「TCT」は、鋳型となるゲノムDNAの塩基配列とはミスマッチであり、3'側に隣接する塩基「AG」と後述のPCRにより増幅される最初の塩基とともに、制限酵素Xba Iの切断認識部位(「TCTAGA」)となりうるために設計された配列である。すなわち、PCRにより増幅される最初の塩基がAである場合には、プライマー8により増幅される断片には、制限酵素Xba Iの切断認識部位が含まれることとなる。一方、PCRにより増幅される最初の塩基がA以外である場合には、増幅断片に制限酵素Xba Iの切断認識部位が存在しないこととなる。

【0083】

PCR反応としては、95℃で30秒、55℃で1分及び72℃で2分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で7分間反応を完結させた。この反応の結果、183bpのPCR生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Amersham Biosciences社製)を用いて、PCR生成物を精製し、その後、最終20 μ lの滅菌水で溶出した。この内、7.5 μ lを、10 x M緩衝液(Takara社製)1 μ l、0.1%BSA溶液1 μ l、Xba I 0.5 μ l(12u/ μ l、Takara社製)と混合して最終容量10 μ lとし、37℃で1時間制限酵素反応に供した。反応液全量を3%アガロースに泳動した結果を図10に示した。なお、図10において、レーン2は標準菌株から抽出したゲノムDNAを用いた反応液であり、レーン3は抵抗性菌株から抽出したゲノムDNAを用いた反応液であり、レーン4は標準菌株から抽出したゲノムDNAを用い制限酵素反応を行わなかった反応液であり、レーン5は抵抗性菌株から抽出したゲノムDNAを用い制限酵素反応を行わなかった反応液である。

【0084】

図10より明らかなように、抵抗性株由来のPCR生成物のXba I処理サンプルでは25塩基程短い断片となっていた。この結果から、標準菌株(野性株)と抵抗性菌株の区別がPCR-RFLP法を応用して可能であることが明らかとなった。

【 0 0 8 5 】

【発明の効果】

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、SCDH阻害剤に対する耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することができる遺伝子を提供することができる。また、この遺伝子は、新規なSCDH阻害剤のスクリーニングや、解析対象のいもち病菌におけるSCDH阻害剤に対する感受性の評価等に使用することができる。

【 0 0 8 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

<120> A gene coding for scytalone dehydratase having conferring
resistance to an agricultural fungicidal agent

<130> P02-0049

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 516

<212> DNA

<213> *Pyricularia oryzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(516)

<400> 1

atg ggt tgc caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac 48

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1 5 10 15

ctg ggc ctc atg act tgc gtc tat gag tgg gca gac agc tac gac tcc 96

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20 25 30

aag gac tgg gat agg ctg cga aag gtc att gcg cct act ctg cgc att 144

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile

35 40 45

gac tac cgc tcc ttc ctc gac aag ctc tgg gag gca atg ccg gcc gag 192

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu

50 55 60

gag ttc gtc ggc atg gtc tgc agc aag cag atg ctg ggc gac ccc acc 240

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Met Leu Gly Asp Pro Thr

65 70 75 80

ctc cgc acg cag cac ttc atc ggc ggc acg cgc tgg gag aag gtg tcc 288

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser

85

90

95

gag gac gag gtc atc ggc tac cac cag ctg cgc gtc ccg cac cag agg 336

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg

100

105

110

tac aag gac acc acc atg aag gag gtc acc atg aag ggc cac gcc cac 384

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His

115

120

125

tcg gca aac ctt cac tgg tac aag aag atc gac ggc gtc tgg aag ttc 432

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130

135

140

gcc ggc ctc aag ccc gat atc cgc tgg ggc gag ttc gac ttt gac agg 480

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145

150

155

160

atc ttt gag gac gga cgg gag acc ttt ggc gac aaa

516

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Pyricularia oryzae

<400> 2

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1

5

10

15

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20

25

30

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile

35

40

45

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu

50

55

60

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Met Leu Gly Asp Pro Thr

65

70

75

80

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser

85

90

95

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg

100

105

110

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His

115

120

125

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130

135

140

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145

150

155

160

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 3

<211> 516

<212> DNA

<213> *Pyricularia oryzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(516)

<400> 3

atg ggt tcg caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac 48

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1

5

10

15

ctg ggc ctc atg act tgc gtc tat gag tgg gca gac agc tac gac tcc 96

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20

25

30

aag gac tgg gat agg ctg cga aag gtc att gcg cct act ctg cgc att 144

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile

35

40

45

gac tac cgc tcc ttc ctc gac aag ctc tgg gag gca atg ccg gcc gag 192

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu

50

55

60

gag ttc gtc ggc atg gtc tcg agc aag cag gtg ctg ggc gac ccc acc 240
 Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr

65 70 75 80

ctc cgc acg cag cac ttc atc ggc ggc acg cgc tgg gag aag gtg tcc 288
 Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser

85 90 95

gag gac gag gtc atc ggc tac cac cag ctg cgc gtc ccg cac cag agg 336
 Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg

100 105 110

tac aag gac acc acc atg aag gag gtc acc atg aag ggc cac gcc cac 384
 Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His

115 120 125

tcg gca aac ctt cac tgg tac aag aag atc gac ggc gtc tgg aag ttc 432
 Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130 135 140

gcc ggc ctc aag ccc gat atc cgc tgg ggc gag ttc gac ttt gac agg 480
 Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145 150 155 160

atc ttt gag gac gga cgg gag acc ttt ggc gac aaa 516
 Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165 170

<210> 4

<211> 172

<212> PRT

<213> *Pyricularia oryzae*

<400> 4

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1

5

10

15

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20

25

30

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile

35

40

45

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu

50

55

60

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr

65

70

75

80

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser

85

90

95

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg

100

105

110

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His

115

120

125

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130

135

140

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145

150

155

160

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gcagtgatac ccacaccaaa g

21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ttatttgtcg gcaaaggtct cc

22

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

agttcgaact ggaattcaac cggcacgcat gatgcatgca tttta

44

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

atgggttcgc aagttcaaaa g

21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gtggcccttc atggtgacct cct

23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

acaagctctg ggaggcaatg

20

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

atcgtcgacg tgaattcgtc ttgtaaaagc cgccaac

37

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ttcgctcgga tggctctgag catctag

27

【 0 0 8 7 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 5 ～ 1 2 は、合成プライマーである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

いもち病菌におけるメラニン生合成経路を説明する図である。

【図 2】

シタロンと 1,3,8-THN との UV 吸収スペクトルを示す特性図である。

【図 3】

遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列、標準菌株

のSCDH遺伝子の塩基配列 (cDNA) 及び抵抗性株のSCDH遺伝子の塩基配列 (cDNA) を比較して示す図である。

【図 4】

遺伝子バンクに登録されているいもち病菌のSCDH遺伝子の塩基配列、標準菌株のSCDH遺伝子の塩基配列 (ゲノムDNA) 及び抵抗性株のSCDH遺伝子の塩基配列 (ゲノムDNA) を比較して示す図である。

【図 5】

標準菌株及び抵抗性株 (A及びB) それぞれから抽出した粗酵素液について、カルプロパミド濃度とSCDH酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。

【図 6】

実施例 4 で行った一本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) 解析法の結果を示す電気泳動写真であり、AはGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いた精製を行わずに電気泳動を行った場合の結果である。BはGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いて精製を行った後に電気泳動を行った場合の結果である。

【図 7】

プラスミドRice Blast wild SCDH cDNA及びRice Blast Mutant SCDH cDNAの作製方法を概略的に示す図である。

【図 8】

標準菌株のcDNAを大腸菌中で発現させたGST融合SCDH酵素、抵抗性株のcDNAを大腸菌中で発現させたGST融合SCDH酵素、標準菌株の粗酵素液及び抵抗性株の粗酵素液とについて、カルプロパミド濃度とSCDH酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。

【図 9】

標準菌株のcDNAを大腸菌中で発現させたGST融合SCDH酵素及び抵抗性株のcDNAを大腸菌中で発現させたGST融合SCDH酵素について、フェノキサニル及びジクロシメットの濃度と阻害率との関係を示す特性図である。

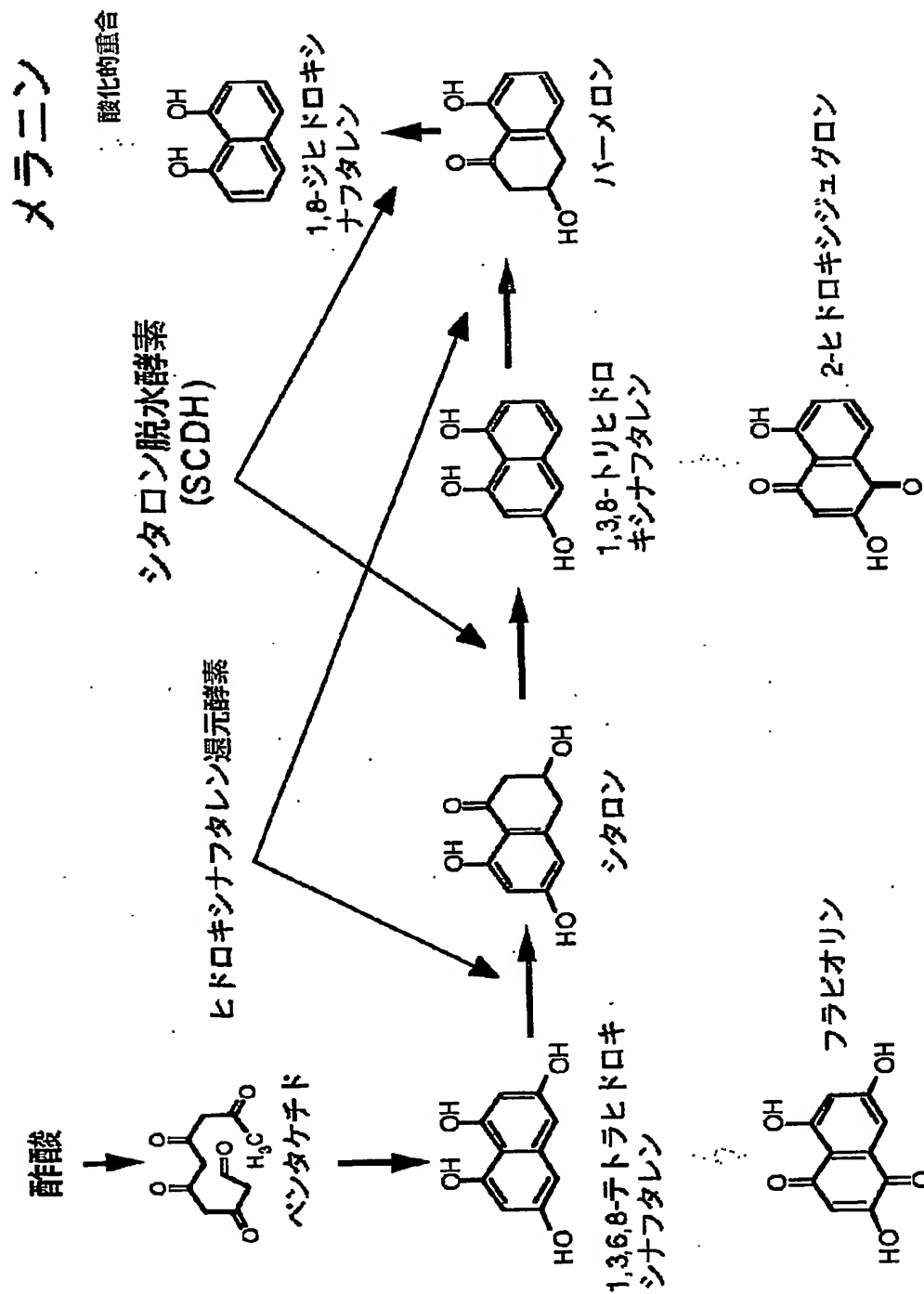
【図 1 0】

実施例 6 で行ったPCR-RFLP法を応用してSCDH酵素における、Val175Met変異を解

析した結果を示す電気泳動写真である。

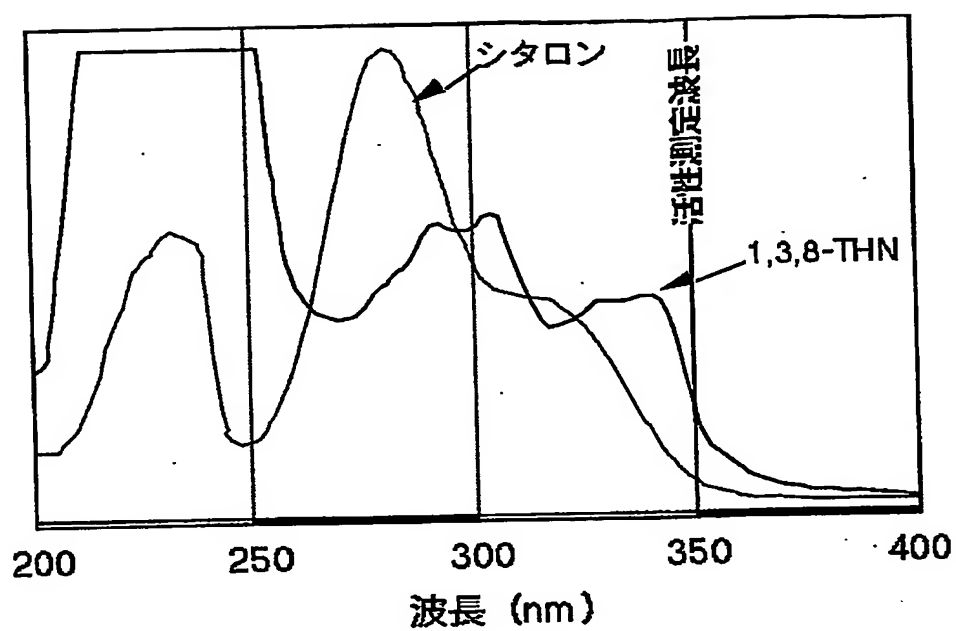
【書類名】 図面

【図 1】



メラニンの生成経路

【図2】



シタロンと1,3,8-THNの
UV吸収スペクトルの比較

【図 3】

P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	-80	CTAGCAACCGCAGTGTATCCCAACCAAGAGCTTCCTTCAGTCTAGTATAGTTTCACTTC	-21
	-37	-----CTAGTATAGTTTCACTTC	-21
	-30	-----AGTTTCACTTC	-21
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	-20	AACCTGTAAAAGCUCGCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
	-20	AACCTGTAAAAGCGCCCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
	-20	AACCTGTAAAAGCGCCCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	41	CAGACTACCTGGGCTCATGACTTTCGCTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAGG	100
	41	CAGACTACCTGGGCTCATGACTTTCGCTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAGG	100
	41	CAGACTACCTGGGCTCATGACTTTCGCTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAGG	100
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGTTCATTGCGCTACTCTGCGCATGACTACCGCTCCCTCC	160
	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGTTCATTGCGCTACTCTGCGCATGACTACCGCTCCCTCC	160
	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGTTCATTGCGCTACTCTGCGCATGACTACCGCTCCCTCC	160
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	161	TCGACAGCTCTGGGAGCAATGCCGGCCGAGGAGTTGGTGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
	161	TCGACAGCTCTGGGAGCAATGCCGGCCGAGGAGTTGGTGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
	161	TCGACAGCTCTGGGAGCAATGCCGGCCGAGGAGTTGGTGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	221	AGGTGCTGGGCGACCCACCTTCGCAACGAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
	221	AGGTGCTGGGCGACCCACCTTCGCAACGAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
	221	AGGTGCTGGGCGACCCACCTTCGCAACGAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATGGCTACCAACAGCTCGCGCTCCCGCACAGAGGTACA	340
	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATGGCTACCAACAGCTCGCGCTCCCGCACAGAGGTACA	340
	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATGGCTACCAACAGCTCGCGCTCCCGCACAGAGGTACA	340
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	341	AGGACACCAACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAACCTTCACT	400
	341	AGGACACCAACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAACCTTCACT	400
	341	AGGACACCAACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAACCTTCACT	400
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTTCGCGCGCTCAAGCCCGATATCCGCTGGG	460
	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTTCGCGCGCTCAAGCCCGATATCCGCTGGG	460
	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTTCGCGCGCTCAAGCCCGATATCCGCTGGG	460
P. oryzae AB004741 標準菌株 抵抗性株	451	GCGAGTTGACTTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGGCGACAAATAAA	520
	451	GCGAGTTGACTTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG-----	508
	451	GCGAGTTGACTTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG-----	508

【图 4】

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	-80	CTAGCAACCGCAGTATACCCACACCAAGAGCTTCCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21
	-46	-----TCCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21
	-47	-----TTCCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	-20	AACTTGTAAGAGCGCCACATGGGTTGCGAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
	-20	AACTTGTAAGAGCGCCACATGGGTTGCGAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
	-20	AACTTGTAAGAGCGCCACATGGGTTGCGAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	41	CA-----	42
	41	CAGGTGAGCATAATATCCCCCTCCAAAAAGAAATAGCGGTGAGCCACCAACGACAGTA	100
	41	CAGGTGAGCATAATATCCCCCTCCAAAAAGAAATAGCGGTGAGCCACCAACGACAGTA	100
**.....			
P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	43	-----GACTACCTGGGCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	79
	101	CCGCTGACCCTAATTCCTCCAGACTACCTGGGCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	160
	101	CCGCTGACCCTAATTCCTCCAGACTACCTGGGCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	160

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	80	CAGCAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAGGTCAATTGCGCTACTCTGC	139
	161	CAGCAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAGGTCAATTGCGCTACTCTGC	220
	161	CAGCAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAGGTCAATTGCGCTACTCTGC	220

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	140	GC-----	141
	221	GCGTATGTTTCGCGCTGCCATGTTTATTTTACTTTCCACACCAATCCAGACTTTAAC	280
	221	GCGTATGTTTCGCGCTGCCATGTTTATTTTACTTTCCACACCAATCCAGACTTTAAC	280
**.....			
P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	142	-----ATTGACTACCGCTCCTTCCTGACAAAGCT	170
	281	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGATTGACTACCGCTCCTTCCTGACAAAGCT	340
	328	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAA---CAGATTGACTACCGCTCCTTCCTGACAAAGCT	336

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	171	CTGGGAGGCAATGCCGCGGAGGAGTTGCTGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGG	230
	341	CTGGGAGGCAATGCCGCGGAGGAGTTGCTGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGG	400
	337	CTGGGAGGCAATGCCGCGGAGGAGTTGCTGGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGG	396

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	231	CGACCCACCCCTCCGACGCGAGCACTTCATCGCGCGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	290
	401	CGACCCACCCCTCCGACGCGAGCACTTCATCGCGCGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	460
	397	CGACCCACCCCTCCGACGCGAGCACTTCATCGCGCGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	456

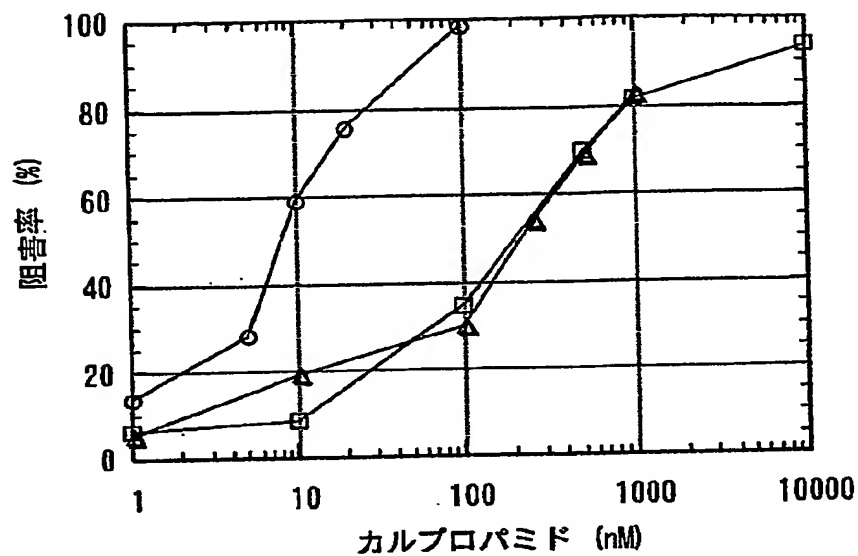
P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	291	GGACGAGGTTCATCGGCTACCAACAGCTGCGCGTCCCGCACAGAGGTACAAGGACACCAC	350
	451	GGACGAGGTTCATCGGCTACCAACAGCTGCGCGTCCCGCACAGAGGTACAAGGACACCAC	520
	457	GGACGAGGTTCATCGGCTACCAACAGCTGCGCGTCCCGCACAGAGGTACAAGGACACCAC	516

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	351	CATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAAAACCTTCCTGGTACAAGAA	410
	521	CATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAAAACCTTCCTGGTACAAGAA	580
	517	CATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCACTCGGCAAAACCTTCCTGGTACAAGAA	576

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	411	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCTCAAGCCCGATATCGCTGGGGCGAGTTGGA	470
	581	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCTCAAGCCCGATATCGCTGGGGCGAGTTGGA	640
	577	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCTCAAGCCCGATATCGCTGGGGCGAGTTGGA	636

P. oryzae AB004741 标准菌株 抵抗性株	471	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGGACAAATAATGCATGCATC	530
	641	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGGACAAATAATGCATGCATC	700
	637	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGGACAAATAATGCATGCATC	696

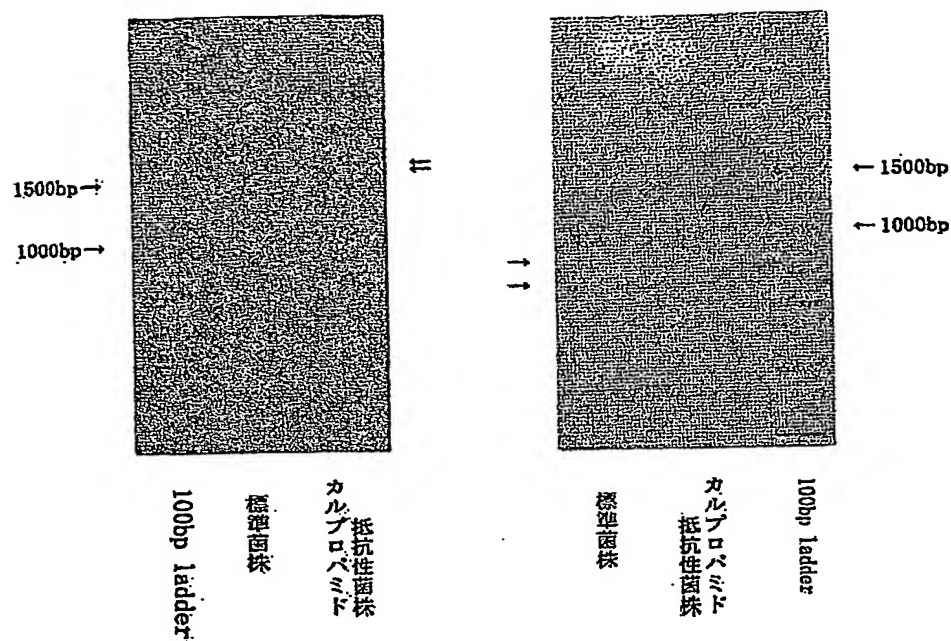
【図 5】



標準(野性)菌株及び抵抗性株(A 及び B)から調製した SCDH 粗酵素のカルプロバミドによる阻害

- , 標準菌株由来の粗酵素液
- △, 抵抗性株 A 由来の粗酵素液
- , 抵抗性株 B からの粗酵素液

【図 6】

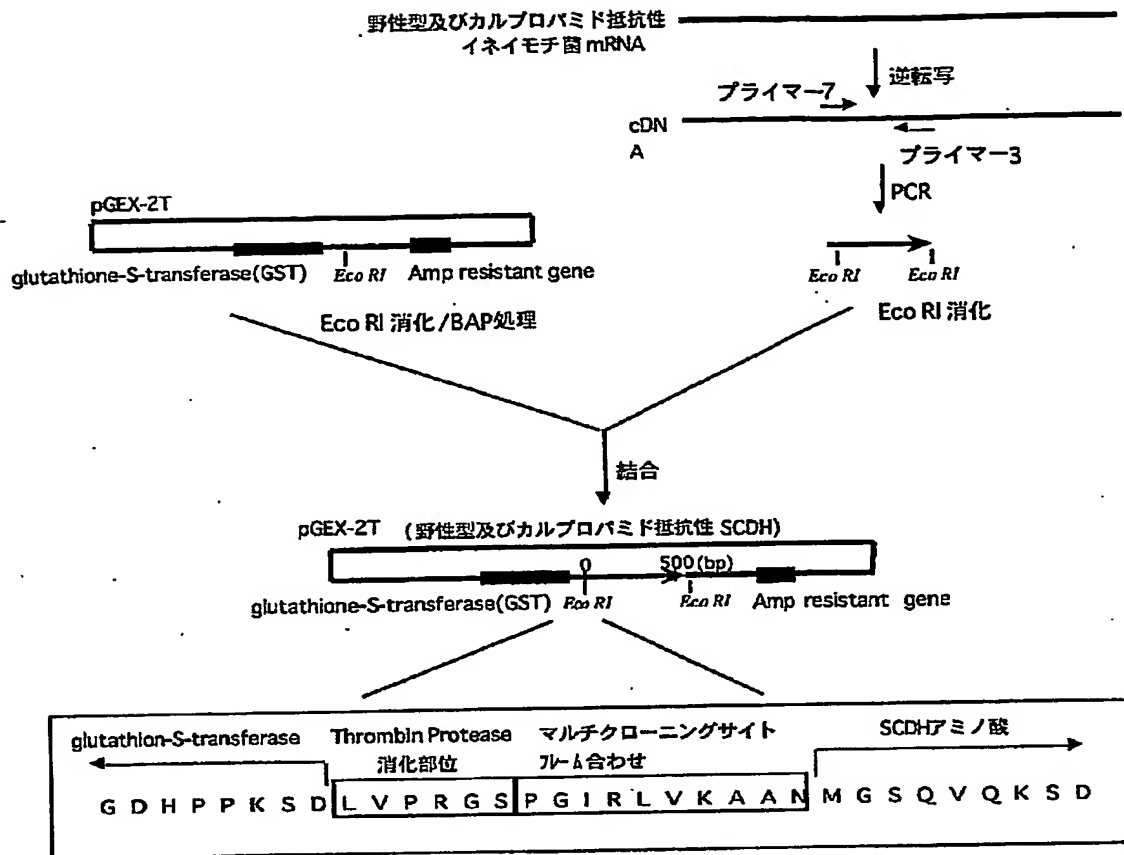


標準菌(野性)株及び抵抗性菌株の PCR 産物を用いた SSCP 結果

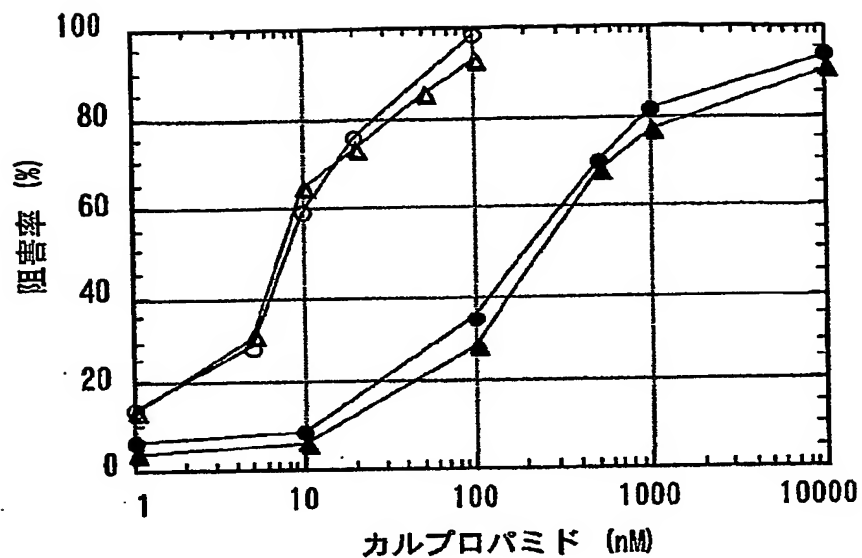
左の写真はPCR反応溶液をそのまま泳動

右の写真はPCR反応溶液を精製して泳動

【図 7】



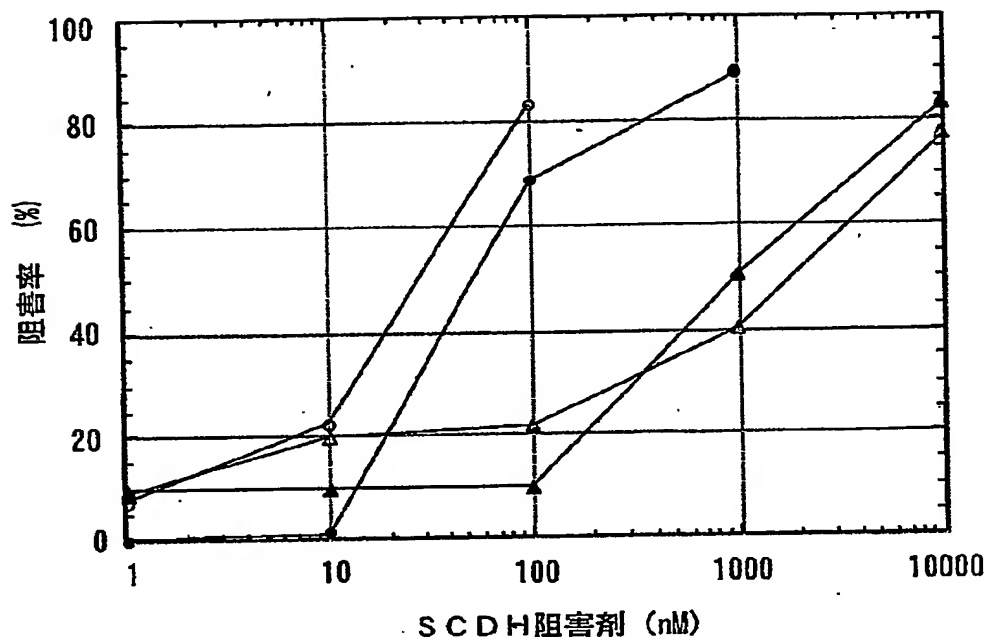
【図 8】



大腸菌で発現した GST 融合 SCDH 酵素と粗酵素液とにおける、カルプロパミドによる阻害活性の比較

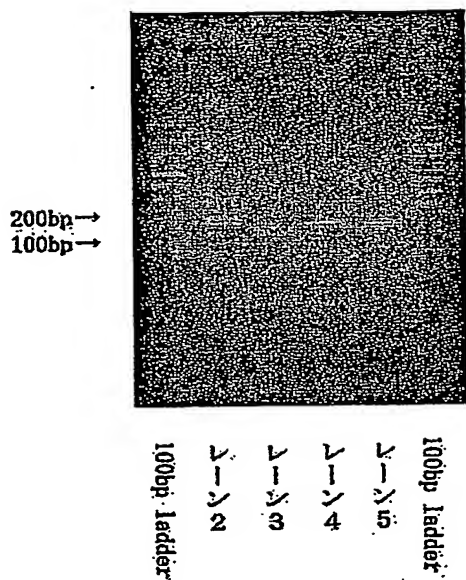
- , 標準菌株由来の粗酵素液
- △, 標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH
- , 抵抗性株由来の粗酵素液
- ▲, 抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH

【図9】



大腸菌で発現した GST 融合 SCDH 酵素の SCDH 阻害剤による阻害活性の比較
 ○, 標準菌株の cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキサニルによる阻害
 △, 抵抗性株の cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキサニルによる阻害
 ●, 標準菌株の cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害
 ▲, 抵抗性株の cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害

【図10】



標準菌株及びカルプロパミド抵抗性菌株の
PCR生成物の RFLP (3%アガロース)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することができる遺伝子を提供する。

【課題手段】 以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子。

（a）配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000169]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都台東区池之端1丁目4番26号
氏 名 クミアイ化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.